

# 水産生物の斃死現象に関する研究 IV

## クロロホルムを使用する 水中PCPの4アミノアンチピリン比色分析法

箕 田 冠 一

### I 緒 言

筆者はさきに本研究第1報において、当時、水中溶存PCPの分析方法として一般に行なわれていたサフラニン-O法について検討改良を加えた結果を報告した。<sup>1)</sup> それにより、同法の問題点の一つとされた再現性はほぼ満足すべきものとなったが、もう一つの点、特異性については、分析法の原理自体に関することであり、問題が残った。よって、各種のPCPの分析法のうち、特異性において優れているとされる4アミノアンチピリンによる比色分析法<sup>2)</sup>を採用することとして、種々検討を加え、昭和38年度以降すべて本法によって分析し、現在に到っている。

PCP問題は昭和37年度頃から全国的な規模で問題となり、各方面の関心も高まり、各種研究の基礎となる分析方法についても幾つかの業績が報告されている<sup>3) 4) 5) 6) 7)</sup>が、農業県である上に、内水面しか持たない当県水産業の特性から来る本問題の重要性と、筆者自身が現場調査等に直接々する立場上の必要から、これらの業績をまたず、独自に検討を進めた。

こゝでは原法のキシロールに代りクロロホルムを用いて好成績を得ていることを中心に、現在筆者等のとっている分析方法を紹介し、大方の参考に供したい。本方法は38年度の頃から見ると大綱には何ら変りはないが、数年に亘る経験から細部は幾分改良も加え、現状ではかなり満足すべき結果を得られるようになって来ている。

この研究に当っては、農業検査所後藤真康、農業技術研究所福永一夫、全能勢和夫、九州大学富山哲夫等の諸氏(順不同)を始め多くの方から有益な助言をうけ、又、PCP協議会、PCP尿素研究会、構成各社の方からも便宜を得ている。こゝに深謝したい。

### II 分 析 方 法

#### 原 理

基本となっている4アミノアンチピリンによる比色分析法<sup>2)</sup>の原理は、水中において、PCPと4アミノアンチピリンとを赤血塩によって酸化して結合せしめ、生成した青色色素をキシロールに抽出して比色定量しようとするものである。この大筋に沿って、多数のしかも有キ物や濁りの多

い試水を処理することを前提として検討した結果以下に述べるような方法を採用に到ったが、その主な点は生成色素はクロロホルムに抽出すること、発色過程はクロロホルム共存下に行なうこと、PHの調整が重要であること、懸濁漁場水中の極微量PCPの濃縮もPHの調整とクロロホルムで行なえば良結果が得られること、等である。

本法は便宜上直接法と、濃縮法に分けているが、直接法ではPCP-OH 10 $\gamma$ は、波長600m $\mu$ で吸光度で約0.067~0.068位の発色を示し、濃縮法で行なっても0.056~0.060位となる。濃縮法では検水500 $\text{CC}$ を用いるから、10 $\gamma$ は濃度にして0.02 ppmとなる。他の方法に比し、簡単で精度も良いものと云えよう。

#### 試 薬

- a) 4アミノアンチピリン0.2%水溶液；特級4アミノアンチピリン( $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ON}_3$ )0.2 $\text{g}$ を純水にとかして100 $\text{CC}$ にする。
- b) 赤血塩10%水溶液；特級 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 $\text{g}$ を純水にとかして100 $\text{CC}$ とする。
- c) 第2リン酸ナトリウム5%緩衝液；特級 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 50 $\text{g}$ を純水にとかして1 $\ell$ とする。
- d) クロロホルム・市販一級品以上をそのまま用いる。
- e) 1:1塩酸；純水100 $\text{CC}$ に対して塩酸 $\text{HCl}$ 100 $\text{CC}$ を混ずる。
- f) 水酸化ナトリウム0.1%水溶液；特級 $\text{NaOH}$ 1 $\text{g}$ を正確に秤りとり 純水にとかして1 $\ell$ にする。
- g) 硼酸4%水溶液； $\text{H}_3\text{BO}_3$ 20 $\text{g}$ を純水にとかして500 $\text{CC}$ とする。
- h) PCP 100 ppm標準原液；

標準としてはペンタクロロフェノールの形で表すのが良いと考えられる。一般に市販されている農薬としてはペンタクロロフェノールナトリウムの形のものである。

分子量から計算すると、両者の関係は、PCP-OH 1.000に対し、PCP-Naは1.082となる。

PCP-OHを基準とする場合は60 $^{\circ}\text{C}$ 数時間乾燥した純品100 $\text{mg}$ をとり、水に難溶であるので、0.1% $\text{NaOH}$ 液20 $\text{CC}$ で完全に溶かし、純水で1 $\ell$ とする。 $\text{NaOH}$ の必要量は計算上は15.01 $\text{CC}$ である。

PCP-Naを基準とする時は108.2 $\text{mg}$ をとり、これは水に易溶であるからそのまま純水に溶して1 $\ell$ とする。いずれの液でも1 $\text{CC}$ 中PCP-OH 100 $\gamma$ を含む。

なおPCP-OHの純度を決定したい時は日本薬局方<sup>8)</sup>所載のm-クレゾールパープルを指示薬とする滴定法が簡単である。

#### 器 具

- a) メスフラスコ、各種
- b) 分液ロト、100 $\text{CC}$ 用、500 $\text{CC}$ 用
- c) メスシリンダー 各種

d) ピペット類各種、特にメス・駒込・10cc便利ピペット等があると至便である。

e) ロット

f) ロ紙

g) 分光々電光度計又は比色計

h) しんとう器

#### 操 作

一応便宜のため、直接法と濃縮法に分けている。直接法は0.2 ppm程度以上の時に至便であり、それ以下の濃度の時には濃縮法によることゝしている。

#### 1) 直 接 法

PCPの濃度が0.1~0.2 ppm以上の時は本法によれば簡単且つ精度よく定量出来る。再現性も特異性も良好である。

a) 試水50ccを100cc用分液ロットにとる。大方の天然淡水ならそのまま供試して差支えない。

b) 第2リン酸ナトリウム水溶液10ccを加える。特殊な水でない限りこれでPH8前後以上になる。異常水の場合はPHを8前後に調整する。

c) クロロホルム10ccを加える。便利ピペットを使用するのが早くて正確である。

d) 4アミノアンチピリン水溶液を1cc加える。

e) 密栓して20~30回しんとうする。

f) 赤血塩液1ccを加え、直ちに1分間強くふる。

g) 静置して分液を待ち、クロロホルム層を小濾紙片(10mm径のもの四分の一位)で濾過し、得られた清澄なクロロホルム層の青色着色を比色定量する。測定波長600m $\mu$ 。Blankはクロロホルム。

h) 別にPCP一標準原液から100%以下、10%位までのPCPを含む数ヶ試料を作り同じ操作をして、検量線を描き、或いは比色の標準とする。この場合、第2リン酸ソーダ10ccにPCPを加えたものも、更に純水を加えて所定の水量としたものでもほぼ等しい値が得られる。この方法で、PCPがあるとクロロホルム層には極めて鮮明な青色が抽出される。PCPの量が少ないとBlankの微黄色と混じて緑色を表すが分光々度計で600m $\mu$ 附近では黄色は妨害にならない。

#### 2) 濃 縮 法

0.2 ppm程度以下の濃度の場合には濃縮の操作が必要である。濃縮には酸性水蒸気蒸溜法が良いがこれは蒸溜の操作だけで数十分を要し、多量のサンプルの処理は不可能である。よって、こゝでは各種有機溶媒による濃縮抽出法のうち特に良好な成績を得られたクロロホルム抽出法を採用することゝした。この方法では一貫してクロロホルムを使用するので煩雑さははぶけ、有機物や懸濁物の多い天然漁場水でもさしたる困難なく分析出来、しかも500ccの試水から約85%前後の回収率で、濃縮抽出出来る。本法で0.01 ppm 即ち5%で吸光度0.03位、10%では吸光度約0.06位の値が得られる。

- a) 試水 500 CC を分液ロトにとる。懸濁の極端な場合はあらかじめ  $\text{NaOH}$  10% 液 1 CC を加えて煮沸放冷後上澄を濾入する。使用試水量を正確に記録すれば必しも正確に 500 CC である必要はない。大方の天然淡水ではそのまま供試することが出来る。
- b) 1 : 1 塩酸 5 CC を加える。
- c) クロロホルム 10 CC を加えて密栓し、50 回強くふる (約 15 秒位)。途中で空気をぬいて気圧調整をはかる。分液をまってクロロホルム層を別の 100 CC 分液ロトに移す。有機物等の多い水ではクロロホルムは小粒となって沈降し、正確な分取が難しくなるが少量の水層が混じるようにとれば良い。この操作を同じ試水についてあと 1 回行ない、あとのクロロホルム層は前のと合する。
- この操作で、ほぼ 100% に近く PCP はクロロホルム層に濃縮抽出される。
- d) 100 CC 分液ロト中のクロロホルム層の上の水をピペットを用いて可能な範囲で取り除く。クロロホルムを除かぬよう注意する。密栓して 50 回程強くふり静置すると速かに分液する。この操作でクロロホルムについていた有機物が分離してフロック状となるからクロロホルム層のみを別の分液ロトに分取する。この操作は蒸留水やそれに近い清澄な水で分液がスムーズな場合には必要がない。
- e) 純水約 50 CC を加えて 50 回強くふってクロロホルム層を洗う。分液をまって水層を捨てる。
- f) 水酸化ナトリウム 0.1% 液 10 CC を加えて 100 回 (約 30 秒) 強くふり、分液をまって水層を分取この操作を前後 2 回繰返し、水層を合する。これで、始めの試水 500 CC 中の PCP は、0.1%  $\text{NaOH}$  20 CC 中に捕集濃縮され、分析の妨害となる天然水中の各種物質も大部除かれている。
- g) 4% 硼酸水 3 CC 及び 5% 第 2 リン酸ソーダ液 10 CC を正確に秤りとり加え攪拌する。これで PH は約 8.5 前後となる。筆者は PH メーターでその都度確めている。PH の調整操作であるから先の  $\text{NaOH}$  0.1% 液 20 CC と共に出来るだけ正確にとると共に、試薬の濃度、変質等にも留意することが望ましい。以下は直接法と全く同じ。
- h) クロロホルム 10 CC 及び 4 アミノアンチピリン 1 CC を加え密栓して 20 ~ 30 回ふる。混合。
- i) 赤血塩液 1 CC を加え直ちに強く 1 分間ふる。
- j) 分液をまちクロロホルム層を濾過し、青色の着色を比色定量する。波長 600 m $\mu$ 、Blank はクロロホルム。
- k) 別に PCP 標準液で同じ操作を行ない検量線を求め、或いは比色の標準とする。
- この方法で、純水では直接法に比しほとんど 100% に近い回収率が得られ、漁場水の場合でも 85% 前後の回収率が得られる。矢張り漁場水などの場合幾分回収率の悪いのは操作に困難が伴い、損失部分が多くなるためと思われる。濃縮法の操作中実際の調査等で得られる漁場水などの場合、d) の操作で有機物のフロックを除くのが重要で、こゝで幾分 PCP のロスもあるかも知れないが、これをそのまま残すとその後の操作が非常に困難になることに留意したい。これを除くと、クロロホルム層にはまだ黄褐色は残るがそれは 0.1%  $\text{NaOH}$  液には移行しないので取除く

ことが出来る。

## ■ 考 察

この分析方法について、特に重要と思われる点について若干触れておきたい。

### 1) PH について

発色過程における PH の影響は重要である。PCP + 4 アミノアンチピリン + 赤血塩で生成する青色色素は、水層のみでは PH が 6 前後の時が最も強い。しかし、その後有機溶媒を加えて抽出するより、溶媒共存下で反応させた方が遙かに安定で且つ強い呈色が得られる。これは、水中での成生色素の不安定さに関連するものと思う。溶媒共存下では、中性以下の PH 域は、PCP 自体が溶媒中に移行するので好結果が得られない。クロロホルム共存下では PH 7.5 から 9 位の範囲で最も良好な結果が得られた。この範囲では、安定した値が得られるようである。PH 緩衝剤の種類による影響はないようである。本分析法では PH は約 8 の前後となる筈である。直接法の時、特殊な水では至適 PH 域をはづれることも理論的には皆無とは云えないからこの点に常に留意すべきである。(実際上はこのようなことは起ることは殆んどない)

濃縮過程における PH も重要である。この濃縮は、試水の酸性化でクロロホルムに抽出し、その後、強アルカリ水で逆にクロロホルムから水溶液状態に再抽出して濃縮、妨害物除去を行なうのが原理となっている。試薬量は充分すぎる程の量とはなっているが、留意したい点である。

### 2) クロロホルム使用について

生成した色素の抽出にクロロホルムを使用するに至った理由は、同一 PCP 濃度で、キシロールよりかなり強い呈色が得られること。筆者の実験ではキシロールの場合 100cc が約 0.42 の吸光度 (波長 580 m $\mu$ , キシロール 10 cc,  $\frac{1}{15}$  M 第 2 リン酸ソーダ 10 cc, 0.2% 4 アミノアンチピリン 2 cc 2 分振とう, 赤血塩 1 cc, 5 分振とう) であるのに反し、本法の場合 0.67 ~ 0.68 位の吸光度 (600 m $\mu$  波長) が得られる。更に、呈色が遙かに鮮明な青色となること、反応が速やかで、時間が著しく短縮出来ること、水との比重差が大で分液が早いこと、引火性がないこと、市販一級品で充分良好な結果を得られること、などによる。実際、振とうの操作一つにしても、振とう器を用いれば別として、実験者が手で数分間同じ強さで振とうすることは非常な努力を要することで、しかも好結果の得られないことが多い。クロロホルムを用いると 50 回 (約 10 ~ 15 秒) で充分である。これらは、PCP 及び生成色素のクロロホルムへの移行し易さ、或いは結びつき易さに関係があるのではないかと考えている。

反面、クロロホルムに移行した青色はキシロールの場合よりやゝ褪色が早いようであるが、夏期 25 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C 位の温度でも少なくとも 1 時間以上は安定で、実用上問題はない。

又、クロロホルムに抽出された青色は、キシロールの場合 574 ~ 575 m $\mu$  が最大吸収波長とされるに対し、これよりやゝ長い波長域に最大吸収域があるようで當場での測定では 590 ~ 600 m $\mu$  位となっている。

次に濃縮の溶媒としてあるが、主に、短時間で、高い回収が期待出来ること及び発色定量操

作との関連性で有利である。PHが充分強酸性であれば、10.0ccのクロロホルムで50回振とうの操作で、殆んど100%に近くPCPを回収することが出来る。これが、本法の迅速化に非常に役立っている。

### 3) 天然妨害物の除去

天然漁場水中には多かれ少なかれ懸濁物、プランクトン、有機物などがかなり含まれて居り、試水50cc→クロロホルム10ccの直接法の時はさほどの障害にならないが、濃縮法で試水500cc→クロロホルム10ccでは妨害物も又著しく濃縮捕集されて来て、クロロホルム層が汚れ、そのまま発色比色の溶媒とすることは好ましくない。よって、一旦クロロホルムに抽出したPCPを更に0.1% NaOHで抽出することにした。本法のようにすると酸性水からクロロホルムに移行しないものが始め除去され、あとの過程で、クロロホルムに移行したもののうち、アルカリ性水溶液に移行しないものが除去出来る。実際に行なってみると、漁場水でかなり富栄養なものでも、前処理なしに供試しても、この2回の抽出で充分天然の妨害物を取り除くことが出来る。

### 4) その他の妨害物

各種の化学物質が、同じ発色操作で各種の色素を生成することが知られている<sup>5)</sup>。特にフェノール系の物質に多いようである。しかし、これらの呈色はいづれもPCPとは全く異った色調のもので、赤一褐一黄色のものが多く、青色を表すものはPCP以外には、今の所知られていないようである。従ってこの反応により生ずる青色はPCPの定性的確認にも用いられている<sup>9)</sup>位で、特異性にすぐれている。他物質による呈色がPCPと異なるため、長波長域での吸光が少ないこと、鋭敏さがPCPよりずっと劣ること、天然水域に於ける濃度が極く少ないことなどのため、實際上、問題となるような妨害発色をみたことは筆者の経験ではなかった。

### 5) 試薬量等について

本法ではブランクテストでもクロロホルム層に黄色の着色が起る。この色の強さは加える4アミノアンチピリンの量に左右される。長波長域では殆んど妨害にならないとは云え、稀薄な濃度区ではPCPの青色と混じて緑色となり、肉眼的判定を困難ならしめるため、4アミノアンチピリン量は、充分な範囲で少なくした。原法等の半量となっているが、その為の影響はない。濃縮の際の酸性化に用いるHCl量は大過剰である。濃縮法で最終的にPHを8前後に調整するのに硼酸を加えただけでも所定のPHになる。更に第2リン酸ソーダを10cc加えているので、緩衝力は充分とは思いますが、留意したい点である。

### 6) その他

クロロホルムは、水に或程度とける。(100ccの水に0.8cc程度<sup>9)</sup>)。従って濃縮法で、最初に加えたそれは、約6cc位しか分取出来ない。しかし、PCPがあると、この最初の6cc位のクロロホルムに大部分抽出されて来る。水にとけて分取出来ないクロロホルムの損失部分にPCPが同じ割合で残ると云うことはない。二回目に加えるクロロホルムは、一回目で分液はしたが微細粒となって浮遊したり、器壁についたりしているクロロホルムを回収したいためのものである。従って、分液、分取がスムーズな清浄水の場合など、クロロホルム20cc1回の抽出でも

100%近い回収率を得ることが出来る。

#### IV 摘 要

水中に溶存する微量のPCPを正確且つ迅速に検出定量することは、その水産被害問題の解明や各種研究の基礎となる重要な技術であるが、その一方法として筆者が昭和38年度以降採用して好成績を得ている4アミノアンチピリン法<sup>2)</sup>の変法について分析方法をのべ、いくつかの考察を加えた。その主な点は以下の通りである。

- 1) 本法の特徴の一つは、生成色素の抽出溶媒としても、濃縮の為の溶媒としても、クロロホルムが優れていることを見出し、一貫してこれを用いることとした点である。
- 2) その結果、所要時間、労力が著しく少なくてすむようになり、しかも精度もかなり大巾に改良された。
- 3) 本法の直接法ではPCP-OHとして10 $\gamma$ が吸光度0.068程度、5 $\gamma$ でも0.034程度の値が得られ、濃縮法でも10 $\gamma$ が0.06、5 $\gamma$ で0.03位の値が得られる。従って濃縮法では0.01~0.02 ppmが検出限界となる。
- 4) キシロールを用いる方法より呈色は遙に鮮明で且つ吸光度はかなり高い。
- 5) かなり富栄養な漁場水でも前処理を必要とせず、妨害物の影響なく良い分析値が得られる。
- 6) 本方法では発色過程でも濃縮の過程でもPHの規整が重要な点である。この点に留意することが望ましい。
- 7) 本法は淡水を対象として考えられているが海水の場合でもPHの調整さえ留意すればそのまま応用し得るものと思われる。

#### V 文 献

- 1) 箕田冠一：水産生物の斃死現象に関する研究—I，滋賀県水産試験場研究報告第17号  
141-146. 1964
- 2) 沼田 一：ペンタクロロフェノールの比色定量について，衛生化学4. 94. 1956
- 3) 保土谷化学研究所：オーラミンによるPCPの微量新比色定量法，プリント，1962
- 4) 能勢和夫・福永一夫：ペンタクロロフェノールの水溶液並びに土壌中における行動，農業生産技術6，農業工業会，27-37. 1962
- 5) 後藤真康・川原哲城・佐藤六郎：天然水中のPCPの分析，農業検査所報告第6号，19-25  
1963.
- 6) PCP微量分析技術会議：水中のPCP微量定量法，プリント，1963
- 7) 富山哲夫・飯盛勝義・斉藤雄：PCPの微量定量法の改良，PCP尿素研究会，試験成績集，1963
- 8) 日本公定書協会：第7改正日本薬局方第1部解説書C-1267-C-1269. 広川書店・東京. 1961
- 9) 塚本久雄・奥井誠一：裁判化学，第3版・南山堂・東京・1-247. 1959
- 10) 後藤真康：私信